AMEA-nın Xəbərləri (biologiyavətibbelmləri), cild70, №2, səh. 25-30 (2015)

Применение RAPD-ПЦР Метода Для Оценки Потенциала Солеустойчивости У Сортов Пшеницы

З.Д. Сулейманова[1,2]*, А.Ч. Мамедов[1,2], А.А. Заманов[3], С.Ю. Сулейманов[1,2,3]

[1] *Институт молекулярной биологии и биотехнологии НАНА, прос. Метбуат 2А, Баку AZ1073, Азербайджан*
[2] *Институт ботаники НАНА, Бадамдарское шоссе, 40, Баку AZ1002, Азербайджан*
**E-mail: jzarifa @yahoo.com*
[3]*Научно-исследовательский институт земледелия, пос. Пиршаги, 2 совхоз, Баку AZ1098, Азербайджан*

Потенциал солеустойчивости 112 сортов пшеницы был проанализирован при помощи известных из литературы RAPD маркеров, сопряженных с одним из генов, контролирующих устойчивость к засолению. При применении маркера OPZ09 у 39 генотипов пшеницы был амплифицирован ожидаемый фрагмент ДНК длиной ~590 п.н. Предполагается, что данный маркер ассоциирован с признаком солевыносливости в исследуемой коллекции.

Ключевые слова: *Пшеница, солеустойчивость, RAPD-ПЦР*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема солеустойчивости растений приобрела громадное теоретическое и практическое значение. Возросший интерес к этой проблеме объясняется широким распространением во многих странах мира засоленных земель, площади которых имеют тенденцию к постоянному и существенному увеличению в результате процессов вторичного засоления, и, вероятно, эта проблема будет обостряться и в будущем, ввиду предсказываемого глобального потепления климата. Последствия почвенного засоления проявляются в снижении продуктивности агро - и биоценозов, в падении биоразнообразия и в серьезных экономических потерях (Shahid and Rahman, 2011). Пшеница является культурой мирового значения из-за своей приспособляемости к самому широкому диапазону климатических условий и качества зерна, наиболее подходящего для производства хлебопекарной муки. Рост населения Земли требует повышения производства сельскохозяйственной продукции к 2050 году не менее чем на 70 % (Tester, Langridge, 2010; Pardey, 2011; http://faostat.fao.org), что делает необходимым увеличение объёмов производства пшеницы во всем мире. Однако фактическая урожайность современных сортов пшеницы во многом лимитируется воздействием абиотических и биотических стрессов. Засоление почвы относится к одному из основных лимитирующих факторов, негативно влияющих на рост и развитие пшеницы. У пшеницы в условиях засоления ухудшается качество зерна и падает урожайность (Turki et al., 2012; Houshm and et al., 2014). Различные сорта одной и той же культуры подчас весьма существенно отличаются по степени солеустойчивости и наследственно сохраняют её в поколениях. Один из аспектов толерантности культурных растений связан с генетическим разнообразием в популяциях растений, которое является результатом качественных и/или количественных изменений в полинуклеотидных последовательностях ДНК (Cullis, 1997). Одним из способов, позволяющих преодолеть негативное воздействие фактора засоления, служит использование наиболее солеустойчивых сортов и форм пшеницы. Отбор и создание устойчивых к засолению генотипов позволит расширить земли, пригодные для сельскохозяйственного использования, и снизить потери урожая.

Внедрение в селекционные программы современных биотехнологических подходов, основанных на использовании молекулярных маркеров, может способствовать решению этих задач. Генетические маркеры играют исключительно важную роль в оценке наследственной конституции организма и служат одним из главных средств селекции. В настоящее время в генбанках растительной гермплазмы молекулярно-генетические исследования становятся общепринятым методом изучения сохраняемого разнообразия эффективным способом, повышения разрешающей способности отбора и сокращения сроков селекционного процесса. Разработка ДНК маркеров хозяйственно-ценных признаков позволило проводить экспресс-оценку растений на устойчивость к стрессорным факторам внешней среды, выявить сорта с высоким

генетическим потенциалом продуктивности. Большое число генов и локусов, контролирующих устойчивость различных видов злаков к биотическим и абиотическим стрессам, признаки урожайности и качества зерна, было идентифицировано и картировано с помощью ДНК-маркеров (Landjeva et al., 2007). Молекулярные маркеры широко используются при изучении структуры генома пшеницы, идентификации и картировании генов, ответственных за проявление полезных свойств, а также для выделения и клонирования генов с целью изучения контролируемых ими свойств и передачи их другим сортам (т.е. для генетической трансформации). По данным J. Dubcovsky (2004), действующая в США программа «MAS wheat» в 2004 г. охватывала около 430 проектов, направленных на перенос 43 генов в 75 родительских форм пшеницы.

Наиболее быстро и легко молекулярные маркеры выявляют с помощью полимеразной ценной реакции (ПЦР). В частности, метод ПЦР с использованием a RAPD праймеров является одним из наиболее эффективных методов для молекулярного скрининга образцов (Williamse-tal, 1990). Важным достоинством RAPD-метода является то, что он позволяет одновременно тестировать большое количество локусов и проводить глобальное сравнение геномов растений для поиска различий. Это преимущество RAPD-анализа используется для поиска маркеров, сцепленных с интересующими генами. Огромное количество RAPD маркеров было получено для идентификации локусов, связанных с количественными признаками, так называемыми QTL локусами. Так, были получены RAPD маркеры, сцепленные с локусом, определяющим засухоустойчивость у ячменя (Nazari and Pakniyat, 2008), пшеницы (Pakniyat and Tavakol, 2007) и риса (Youssef et al., 2010). Было выявлено 6 маркеров, ассоциированных с повышенной урожайностью в условиях температурного стресса (Lin et al., 2006) и 13 RAPD маркеров, сцепленных с 8 локусом, определяющим солеустойчивость томата (Foolad and Chen, 1998). Также были получены маркеры QTL устойчивости к засолению сои (Khan et al., 2013), горчицы (Younis et al., 2007), кукурузы (Balkrishna and Shankarrao, 2013), пшеницы (Bhutta and Hanif, 2013) и ячменя (Pakniyat and Namayandeh 2004). Были получены многочисленные RAPD маркеры, связанные с QTL устойчивостью к различным болезням растений.

В связи с выше изложенным, целью наших исследований является оценить адаптивный потенциал районированных в Азербайджане местных и интродуцированных сортов мягкой и твердой пшеницы к засолению с помощью RAPD маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований послужили 72 образца *Triticum aestivum* L. и 40 образцов *Triticum durum* Desf., отобранных из коллекции Генбанка Азербайджанского Научно-исследовательского института земледелия (Табл.1).

Экстракцию ДНК из листового материала пшеницы проводили по методу CTAB (Murray and Tompson, 1980). Нами были изменены некоторые стадии выделения и подобраны оптимальные временные, температурные и концентрационные условия, что дало возможность получить образец ДНК с отсутствием деградации и примесей, что было подтверждено спектрофотометрически и электрофореграммой полученных препаратов. После очистки и разведения до концентрации 10 мкг/мл, препараты ДНК амплифицировали с помощью пяти RAPD-праймеров произвольных последовательностей: OPA2 (5'-TGCCGAGCTG-3'), OPF13 (5'-GGCTGCAGAA-3'), OPN13 (5'-AGCGTCACTC-3'), OPZ09 (5'-CACCCCAGTC-3'), GLE14 (5'-TGCGTGCTTG-3'), («Operon Technologies», США). Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 50 нг ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ каждого: dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ $MgCl_2$ и 1 ед. Taq-полимеразы в инкубационном буфере. ПЦР проводили в амплификаторе «Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler» (Сингапур) по следующему температурному профилю: начальная денатурация 2 мин при 94°C, следующие 35 циклов по схеме 94°C (60 сек), 35°C (40 сек), 72°C (40 сек) и конечная элонгация 7 мин при 72°C. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле с трис-ацетатным буфером, гели окрашивали бромистым этидием (1мкг/мл), визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью «Gel Documentation System» («UVI-PRO», СК). Анализ молекулярной массы фрагментов осуществляли относительно маркера 100 bp ladder DNA marker (Fermentas).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма и источником уникальных локус-специфичных маркеров, что особенно актуально для работы с генетическим раз-

нообразием. С целью поиска генетических маркеров, ассоциированных с устойчивостью к засолению, 112 образцов мягкой и твердой пшеницы были проанализированы при помощи метода RAPD-ПЦР. По литературным данным отобраны пять произвольных декамерных праймеров, инициированные фрагменты ДНК, ассоциированные с локусом, контролирующим устойчивость пшеницы к засолению. При амплификации маркеров OPA2, OPM13, OPF13 ожидаемые фрагменты ДНК отсутствовали у всех изученных образцов. При применении праймера GLE14 ожидаемый фрагмент ДНК размером 970 п.н., присутствовал у всех образцов, что не позволяет дифференцировать устойчивые и восприимчивые образцы. Это говорит о том, что амплифицированный фрагмент ДНК не сцеплен с признаком устойчивости в исследуемой коллекции. Таким образом, полученные результаты показали отсутствие эффективности выше отмеченных 4-ых RAPD маркеров в представленной коллекции образцов. Из протестированных 5 RAPD праймеров только OPZ09 оказался информативным для дифференциации устойчивых и чувствительных образцов пшеницы. Примеры полученных профилей с использованием праймера OPZ09, представлены на рис.1 и 2.

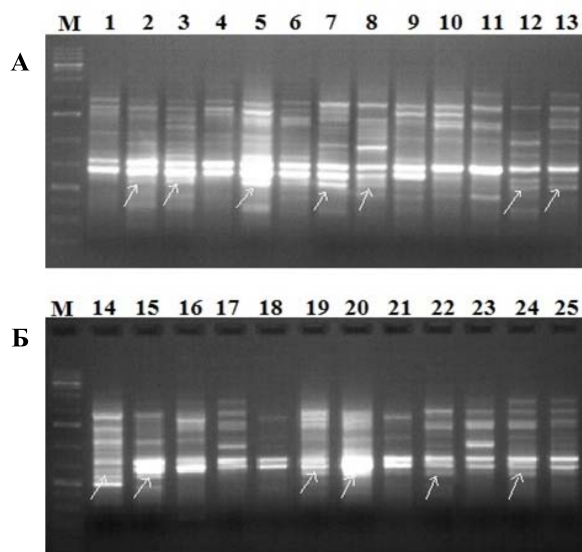


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК образцов *T. aestivum* с праймером OPZ09. Стрелкой обозначен ожидаемый полиморфный фрагмент размером ~590 п.н., М - ДНК маркер с молекулярным весом 100 п.н.
А) 1. Перзиван - 1, 2. Перзиван-2, 3. Леягатли-80, 4. Угур, 5. Муров, 6. Гызылбугда, 7. Богданка, 8. Агали, 9. Baba-75, 10. Фарахим, 11. Парвин, 12. Егана, 13. Аран
Б) 14. Дагдаш, 15. Гюнашли, 16. Тарагги, 17. Зирва-85, 18. Рузи-84, 19. Безостая, 20. Муров-2, 21. №32, 22. Мирбашир-128, 23. Пиршахин, 24. Азери, 25. Шафаг-2.

Видно, что среди продуктов амплификации данного праймера появляется полиморфный ампликон размером около 590 п.н., наличие которого характерно для устойчивых генотипов. Наши результаты близки к результатам, полученным в работе Weng и Chen (2002), которые использовали маркер на своей популяции. Указанный фрагмент был выявлен в геноме у 28 образцов мягкой и у 11 образцов твердой пшеницы (таблица).

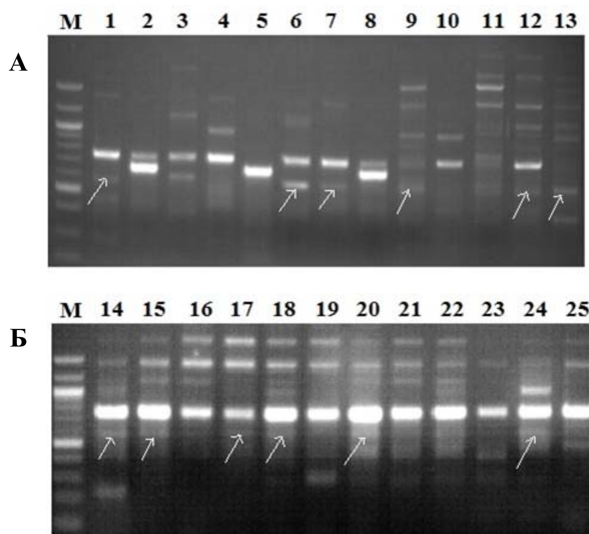


Рис.2. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК образцов *T.durum* с праймером OPZ09. Стрелкой обозначен ожидаемый полиморфный фрагмент размером ~590 п.н., М – маркер с молекулярным веса 100 п.н.
А) 1. Вугар, 2. Мирбашир-50, 3. Шарг, 4. Ягут, 5. Тертер, 6. Кахраба, 7. Ширван 3, 8. Ширван 5, 9-Карабах, 10-Ягут, 11-Туран, 12-Муган, 13. Агбугда
Б) 14. 34th IDON-MD(№77), 15. 34th IDON-MD(№78), 16. 34th IDON-MD (№79), 17. 34th IDON-MD (№80), 18. 34th IDON-MD (№81), 19. 34th IDON-MD (№82), 20. 34th IDON-MD (№83), 21. 34th IDON-MD (№84), 22. 34th IDYT-MD (№85), 23. 34th IDYT-MD(№86), 24. 34th IDYT-MD(№87), 25. 34th IDYT-MD(№88)

Таблица. Результат скрининга $OPZ09_{590}$ маркера в геномах 112 сортов пшеницы: „+" маркер присутствует

T.aesivum	
Название генотипа	**OPZ09 (590bp)**
Азаметли-95	+
Тале-38	+
Рузи-84	
Муров-2	++
Саратовская-29	
Гюнашли	+
Гырмызыгюль	
Гобустан	++
Акинчи-84	
Саба	
Леягатли-80	+
Шеки-1	
Аран	+
Ni477	
Агалы	+

продолжение таблицы

Сонмаз	
Фарахим-2012	
Безостая	+
Баба-75	
Гонам	+
Нурлу-99	++
Гийматли 2/17	+
Муров	
Дагдаш	+
Фатима	
Зирва-85	
Баяз	
Тарагги	
Угур	
Егана	+
Мирбашир-128	+
Пиршахин	
Азари	+
Шафаг-2	
130/21	
130/32	
Парвин	
Гызылбугда	
Парзиван-1	
Парзиван-2	+
Гилавар	
Хазри	
Мироновка	
Богданка	++
Махмуд-80	
Мархал	
№4 Pactole	
№13 F0F02N7N6	+
№14 D8 сечма	
№15S4	
№16 AYTSİR5081	
№17 11st IWWYT-IR	
№18 3RBWYT	
№19 15th FAWWON-IR	+
№20 S3	+
№21 $F0_2N208$	+
№22 $F0_2N2N308$	+
№23 S1	+
№24 DDN_2	
№25 THN1	
№26 F02N1109	+
№28 30 ESWYT	
№29 42 IBWSN	+
№32 SFO_7N_4	
№33 42 IBWSN	++
№34 17th FAWWON-IR	+
№35 17th FAWWON-IR	
№36 17th FAWWON-IR	
№37 17th FAWWON-IR	
№39 13th FAWWON-IR	
№44 17th FAWWON-SA	
№45 S5	
T.durum	
Баракатли-95	
Гырмызы бугда	
Гарагылчыг	
Шираслан	
Тертер	
Алинджа-84	+
Ширван-3	+
Ширван-5	
Карабах	+
Ягут	
Туран	
Муган	+
Агбугда	+
Кахраба	++
Мирвари	
Шарг	
Вугар	+
Мирбашир-50	
Тертер-2	
№ 68 33rd İDYT-MD	
№ 69 33rd İDYT-MD	
№ 70 33rd İDYT-MD	
№ 71 SFO_8N_{66}	
№ 72 34th IDON-MD	
№ 73 34th IDON-MD	
№ 74 34th IDON-MD	
№ 75 34th IDON-MD	
№ 76 34th IDON-MD	
№ 77 34th IDON-MD	+
№ 78 34th IDON-MD	+
№ 79 34th IDON-MD	
№ 80 34th IDON-MD	
№ 81 34th IDON-MD	
№ 82 34th IDON-MD	
№ 83 34th IDON-MD	+
№ 84 34th IDON-MD	
№ 85 34th IDYT-MD	
№ 86 34th IDYT-MD	
№ 87 34th IDYT-MD	+
№ 88 34th IDYT-MD	

Таким образом, проанализировав все использованные в работе маркеры, мы выявили, что только один из них, именно OPZ09 пригоден для оценки потенциала солеустойчивости исследуемой коллекции. Эти данные наводят на мысль, что маркер может быть ассоциирован с геном, контролирующим признаки солевыносливости пшеницы.

Полученные данные позволяют рассматривать RAPD анализ, как перспективный метод для различения генотипов по хозяйственно важным признакам. Однако RAPD-анализ выявляет анонимные участки генома. Для того, чтобы идентифицировать конкретные участки ДНК необходимо разработать SCAR - маркер на основе вышеуказанного RAPD-фрагмента. SCAR-праймеры с высокой специфичностью и воспроизводимостью обычно амплифицируют одну полосу и позволяют идентифицировать определенные участки.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при материальной поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (Грант № (EIF-2013-(9/15) - 46/30/3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Balkrishna R.A., Shankarrao Sh.S. (2013) In vitro screening and molecular genetic markers associated with salt tolerance in maize. *African Journal of Biotechnology,* **12(27):** 4251-4255.

Cullis C.A. (1997) The environment as a native generator of adaptive genomic variation. *Plant adaptations to stress environments.* Ed. H.R.Lerner. New York: p. 149–160.

Dubcovsky J. (2004) Marker-assisted selection in-public breeding programs: the wheat experience. *Crop Sci.,* **44:** 1895–1898.

Foolad M.R., Chen F.Q. (1998) RAPD markers associated with salt tolerance in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum×L. pennellii*). *Plant Cell Reports,* **17(4):** 306-312.

Haushmand S., Arzani A., Mirmohammadi-Maibody S. (2014) Effects of salinity and drough stress on grain quality of durum wheat. *Commun. SoilSci. And PlantAnalysis,* **45:** 297-308.

Kesseli R.V., Paran I., Michelmore R.W. (1992) Efficient mapping of specifically, targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable genetic markers. *Applicationof RAPD TechnologytoPlantBreeding,* p. 31-36.

Khan F., Hakeem K.R, Siddqi T.O., Ahmad A. (2013) RAPD Markers Associated with Salt Tolerance in Soybean Genotypes Under SaltStress. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* **170(2):** 257-272.

Landjeva S., Korzun V., Börner A. (2007) Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphitica,* **156:** 271−296.

Lin K.H., Lo H.F., Lee S.P., Kuo C.G., Chen J.T., Yeh W.L. (2006) RAPD markers for the identification of yield traits in tomatoes under heat stress via bulked segregant analysis. *Hereditas,* p. 142-154.

Nazari N., Pakniyat H. (2008) Geneticdiversity of wild and cultivated barley genotypes under-drought stress using RAPD markers. *Biotechnology,* **7(4):** 745-750.

Pakniyat H., Namayandeh A. (2007) Salt tolerance associations with RAPD markers in *Hordeum vulgare L* and*H. Spontaneum* C.Koch. *Pak. J. Biol. Sci.*, **10:** 1317-1320.

Pakniyat H., Tavakol E. (2007) RAPD markers associated with drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Biol. Sci.*, **10:** 3237-3239.

Pardey P.G. (2011) A strategic look at global wheat production, productivity and R&D developments. *Czech. J. Genet. Plant Breed.***, 47:** 9–19.

Shahid S.A., Rahman K. (2011) Soil salinity development, classification, assessment and management in irrigated agriculture. *Hand book of plant and crop stress.* 3ndedition. Ed. M.Pessarakli. CRC press Taylor & FrancisCroup: p. 23-38.

Tester M., Langridge P. (2010) Breeding technologies to increase crop production in a changing-world. *Science,* **237:** 818–822.

Turki N., Harrabi M., Okuno K. (2012) Effect of salinity on grain yield and quality of wheat and genetic relationships among durum and common wheat. *J. Arid Land Studies,* **22(1):** 311-314.

Weng Y-J., Chen D-M. (2002) Molecular markers and its clone for salt tolerance gene in wheat. *JGG,* **29(4):** 343-349.

Williams Y.G.K. Kubelik A.R., Livak K.J. etal. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.*, **18(22):** 6531-6535.

Younis A.A., Ahmed M. F., EL-Menshawi M.M. (2007) Molecular genetic marker sassociated with salt tolerance in grain sorghum. *Arab J. Biotech.***, 10(2):** 249-258.

Youssef M.A., Mansour A., Solliman S.S. (2010) Molecular markers for new promising drought tolerant lines of rice under drought stress via RAPD-PCR and ISSR markers. *Journal ofAmerican Science*, **6(12):** 355-363.

Buğda Sortlarında Duzadavamlılıq Potensialının Qiymətləndirilməsində RAPD-PZR MetodununTətbiqi

Z.C. Süleymanova[1,2], Ə.Ç. Məmmədov[1,2], A.A. Zamanov[3], S.Y. Süleymanov[1,2,3]

[1]AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiya İnstitutu
[2]AMEA Botanika İnstitutu
[3]Azərbaycan Elmi-Tədqiqat Əkinçilik İnstitutu

Duzadavamlılığı idarə edən genlərlə əlaqədə olan məlum RAPD-markerlərin köməyi ilə112 buğda sortu duzadavamlılıq potensialına görə analiz olunmuşdur. RAPD praymer-OPZ09 ilə aparılan PZR nəticəsində tədqiq olunan genotiplərin 39-da uzunluğu 590 n.c.-dən ibarət olan gözlənilən DNT fraqmenti amplifikasiya olunmuşdur. Bu markerin tədqiq olunan kolleksiyada duza tolerantlıq əlaməti ilə bağlı olduğu güman edilir.

Açar sözlər: *Buğda, duzadavamlılıq, RAPD-PZR*

The Assessment Of Salt Tolerance Potential In Wheat Varieties By Applying the RAPD-PCR Method

Z.C. Suleymanov[1,2], A .Ch. Mammadov[1,2], A.A. Zamanov[3], S.Y. Suleymanov[1,2,3]

[1] Institute of Molecular Biology and Biotechnology, ANAS
[2] Institute of Botany, ANAS
[3] Azerbaijan Reserch Institute of Crop Husbandry

Salinity tolerance potensial have been analyzed in 112 wheat varities by using the well known RAPD markers associated with one of the genes controlling resistance to salinty. Using OPZ09 marker the expected DNA fragment of ~ 590 bp was amplified in 39 wheat gentypes. This marker is probably associated with salinity tolerance traits of the studied collection.

Key words: *Wheat, salt tolerance, RAPD-PCR*